

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
1 mai 2003 (01.05.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/035905 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12Q 1/68, 1/04

(74) Mandataire : DOMANGE, Maxime; Cabinet Beau de Loménie, 232, avenue du Prado, F-13295 Marseille Cedex 08 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR02/03566

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :

18 octobre 2002 (18.10.2002)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

01/13573 22 octobre 2001 (22.10.2001) FR

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).



(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE [FR/FR]; Jardin du Pharo, 58, boulevard Charles Livon, F-13284 Marseille Cedex 07 (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING BACTERIOSTATIC OR BACTERICIDAL ACTIVITY OF ANTIBIOTIC AGENTS BY QUANTITATIVE PCR

(54) Titre : METHODE DE DETERMINATION DE L'ACTIVITE BACTERIOSTATIQUE OU BACTERICIDE DES AGENTS ANTIBIOTIQUES PAR PCR QUANTITATIVE

WO 03/035905 A2

(57) Abstract: The invention concerns a method for determining bacteria sensitivity (bacteriostatic effect, that is minimal inhibitory concentration or MIC) in cellular medium or in germ-free medium, by assay of a bacterial suspension in the presence or not of an antibiotic tested at several specific concentration levels, by quantitative PCR. In such conditions, a biostatic effect corresponds to a bacterial count after incubation in the presence of the antibiotic not more than the initial bacterial count (or inoculum), whereas a control without antibiotic (growth control) shows gradual increase of the bacterial count in time.

(57) Abrégé : L'invention concerne une méthode de détermination de la sensibilité des bactéries (effet bactériostatique, soit concentration minimale inhibitrice ou CMI) en milieu cellulaire ou en milieu axénique, par titrage d'une suspension bactérienne en présence ou non d'un antibiotique testé à une ou plusieurs concentrations données, par méthode de PCR quantitative. Dans ces conditions, un effet bactériostatique correspond à un titre bactérien après incubation en présence de l'antibiotique inférieur ou égal à celui du titre bactérien initial (ou inoculum), alors qu'un témoin sans antibiotique (témoin de croissance) montre une élévation progressive du titre bactérien au cours du temps.

Méthode de détermination de l'activité bactériostatique ou bactéricide des agents antibiotiques par PCR quantitative.

La présente invention concerne la détermination de la sensibilité aux 5 antibiotiques des bactéries intracellulaires en milieu cellulaire, ou des bactéries à croissance extra cellulaire en milieu axénique, par méthode de PCR quantitative.

La présente invention concerne plus précisément la détermination de l'activité bactériostatique ou bactéricide de différents agents antibiotiques vis à vis de bactéries à croissance intracellulaire et/ou en milieu axénique.

10 L'activité des antibiotiques est actuellement mesurée en culture cellulaire pour les bactéries intracellulaires strictes, et/ou en culture axénique pour les autres bactéries, en milieu liquide ou en milieu solide. Deux types de mesure sont classiquement effectués par, d'une part l'activité bactériostatique qui empêche la croissance des bactéries, on mesure alors la concentration minimale 15 inhibitrice (CMI) et d'autre part l'activité bactéricide qui entraîne la disparition des bactéries vivantes, et pour laquelle on mesure alors la concentration minimale bactéricide (CMB).

La présente invention concerne également une méthode qui permet de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un antibiotique donné vis 20 à vis d'une souche bactérienne donnée, selon la définition universellement reconnue, c'est-à-dire la plus petite concentration d'antibiotique empêchant toute croissance bactérienne par rapport à un contrôle de croissance ne contenant pas l'antibiotique testé.

La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la plus petite 25 concentration d'antibiotiques entraînant une diminution de 10^3 ou 10^4 - selon les standards reconnus - du titre bactérien de l'inoculum initial.

Le principe de la détermination de l'effet bactériostatique d'un antibiotique est de quantifier la croissance bactérienne en présence ou non d'un antibiotique donné, cet antibiotique étant considéré comme bactériostatique s'il est capable 30 de bloquer la croissance bactérienne. Pour ce faire, la quantité de bactéries contenue dans une suspension bactérienne est déterminée en début d'expérimentation (inoculum) et après incubation de la culture en présence ou en absence (témoin de croissance) de l'antibiotique testé. Un antibiotique est dit

bactériostatique si après un temps donné d'incubation des cultures bactériennes, le titre bactérien dans la culture contenant l'antibiotique est inférieur ou égal au titre de l'inoculum, alors qu'une augmentation significative de ce titre est détectée au niveau du témoin de croissance.

5 Les différentes méthodes d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries à croissance en milieu axénique utilisent ce principe de base, mais varient par la technique de mesure de la croissance bactérienne qui est basée soit sur le compte des unités formant colonie après repiquage des suspensions bactériennes sur milieu gélosé (ufc/ml), soit sur une technique turbidimétrique 10 par mesure de la densité optique de la suspension, soit encore sur la détection d'un métabolite bactérien tel que la production de CO₂ ou de tout autre métabolite (5,6).

Il n'existe pas à ce jour de méthode de détermination de l'activité 15 bactériostatique ou bactéricide d'un antibiotique vis à vis d'une bactérie donnée, qui puisse être applicable à tout type de bactérie.

Dans les méthodes connues on réalise des cultures cellulaires et le temps 20 d'incubation minimum des cultures permettant de différencier de façon statistiquement significatives le titre bactérien obtenu après ledit temps d'incubation dans la culture sans antibiotique par rapport à l'inoculum de départ est en pratique courante un temps correspondant à une multiplication du titre bactérien après incubation d'un facteur d'au moins 10⁵ plus généralement 25 supérieur à 10⁹, par rapport à l'inoculum de départ. Le temps d'incubation des cultures est ainsi fixé arbitrairement à 18 heures pour les techniques conventionnelles appliquées aux bactéries à croissance rapide en milieu axénique, mais peut être de plusieurs jours pour les bactéries à croissance lente 30 en milieu axénique ou en milieu cellulaire dans la mesure où le temps d'incubation dépend bien évidemment du temps de doublement de la bactérie, c'est-à-dire sa vitesse de croissance.

En outre, pour certaines bactéries, les méthodes conventionnelles ne sont 35 pas applicables. En particulier, les investigations entreprises par les inventeurs ont été initialement justifiées par la nécessité de déterminer la sensibilité aux antibiotiques de bactéries *Rickettsia felis*, une bactérie isolée et caractérisée récemment (7) pour laquelle les méthodes utilisées habituellement pour

déterminer l'activité des antibiotiques vis à vis de ce groupe bactérien n'était pas applicable.

Les rickettsies sont des bactéries intracellulaires strictes, nécessitant pour leur culture des systèmes cellulaires. La détermination de leur sensibilité aux antibiotiques ne peut donc être réalisée par les méthodes de bactériologie conventionnelle, mais nécessite l'utilisation de modèles cellulaires, et est habituellement réalisée en laboratoire de recherche disposant des ces techniques. Deux modèles ont été développés par le passé, notamment le modèle des plages de lyse (qui est considéré comme modèle de référence) et le modèle colorimétrique (« dye uptake assay ») (4). Toutefois ces modèles demeurent de réalisation fastidieuse, et ne sont pas applicables à des souches ou espèces de rickettsies qui poussent difficilement sur les modèles cellulaires habituels (en particulier I sur cellules Vero) et/ou ne produisent pas de plages de lyse sur ces cultures cellulaires. C'est le cas en particulier de *R. felis*, qui a été isolée sur cellules de crapaud (XTC2) et ne produit pas ni sur cellules Vero ni sur XTC2 de plages de lyse. Il était donc nécessaire de développer de nouvelles techniques non basées sur la formation de plages de lyse et de réalisation moins fastidieuse.

On connaît également des techniques automatisées impliquant des temps d'incubation de 6 à 8 heures (5). Le système automatisé le plus innovant et le plus rapide à ce jour est le système VITEK 2® (bioMérieux-Vitek). D'autres systèmes automatisés existent : notamment le système WalkAway® (McDade, USA), ou le système PHOENIX® (Becton Dickinson). Dans le système VITEK 2®, l'activité d'un antibiotique vis à vis d'une bactérie donnée est évaluée par détermination de sa croissance au cours du temps en présence d'une concentration donnée de cet antibiotique, ceci par mesure de fluorescence. La courbe de croissance obtenue pour une souche donnée est comparée à différentes courbes prédéterminées pour le micro-organisme considéré, qui varient en fonction du mécanisme de résistance acquise de ce germe (5). La technique VITEK 2® permet de plus, grâce à un algorithme spécifique, de calculer une CMI approchée (5). Enfin, par l'étude de la sensibilité d'une souche particulière à plusieurs molécules antibiotiques d'une même famille, la technique

VITEK 2® permet de définir des phénotypes plus ou moins rares et donc une expertise de la sensibilité antibiotique observée (5). Les limites principales de la technique VITEK 2®, et des systèmes automatisés de façon générale, sont : 1) un spectre de bactéries pouvant être testées par cette méthode restreint aux 5 bactéries de croissance en milieu axénique, et plus particulièrement à celles dont la croissance peut être obtenue en milieu simple (non enrichi) ; 2) pour le système VITEK 2® un spectre encore plus réduit car dépendant de la disponibilité ou non de courbes de croissance en présence de l'antibiotique préétablies ; 3) pour le système VITEK 2® une interprétation de la sensibilité 10 aux antibiotiques qui est dépendante de l'obtention parallèle d'une identification bactérienne (permettant de définir quel type de courbes préétablies utiliser) ; 4) pour le système VITEK 2® l'absence de détermination « vraie » d'une CMI (la CMI étant seulement déduite du type de courbe de croissance). 5) pour les 15 autres systèmes automatisés, un délai de détermination des CMI proche des techniques conventionnelles, à savoir ~18 heures.

Les techniques d'amplification enzymatique d'ADN de type PCR ou d'ARN messager de type RT-PCR (après réversion initiale de l'ARN en ADN par une enzyme de type reverse transcriptase) sont bien connues de l'homme de l'art. Habituellement, ces techniques permettent d'obtenir un nombre élevé de copies 20 d'ADN par amplification à partir d'une source qui contient peu d'ADN ou d'ARN. Toutefois, le nombre final de copies d'ADN obtenues n'est pas directement corrélé au nombre de copies présentes dans l'échantillon initial. Les techniques 25 de quantification d'ADN (29) ou d'ARN (30) par méthodes de PCR ou RT-PCR quantitatives ont été développées plus récemment. Dans ces techniques, la quantification de l'ADN à partir de la source cible est réalisée d'après la cinétique d'amplification de l'ADN ou ARN cible, mesurée en temps réel par incorporation progressive d'un composé fluorescent à l'ADN néoformé et mesure de la fluorescence émise.

Les techniques de PCR quantitatives ont été utilisées à la quantification 30 de copie d'ADN bactérien, notamment dans du tissu humain ou animal (1, 2). Les techniques de PCR quantitatives ont aussi été appliquées à la détection d'un mécanisme moléculaire particulier de résistance aux antibiotiques, notamment chez *Mycobacterium tuberculosis* (3) ou *Helicobacter pylori* (9). Dans ce dernier

cas, il s'agissait de mettre en évidence directement une mutation survenue sur un ADN bactérien cible d'un antibiotique donné, et donc responsable d'une résistance acquise à cet antibiotique. Mais, la technique utilisée ne nécessitait pas de quantification des copies d'ADN bactérien dans la mesure où elle 5 détectait une résistance acquise à un antibiotique par la mise en évidence d'une mutation.

Un but de la présente invention était de fournir une méthode d'évaluation de l'activité bactériostatique ou bactéricide d'un antibiotique vis à vis d'une bactérie qui soit applicable à tout type de bactérie, notamment de bactérie 10 intracellulaire ou bactérie à croissance en milieu axénique.

Un autre but de la présente invention était de fournir une méthode qui permette de mesurer l'activité des antibiotiques sur les bactéries en un temps significativement plus court que les techniques disponibles actuellement.

Un autre but de la présente invention était de fournir une méthode qui 15 puisse être applicable en routine de laboratoire d'analyse biologique.

Un autre but de la présente invention était de fournir une méthode qui puisse être utilisable quel que soit le mécanisme moléculaire impliqué dans la résistance, y compris lorsque ce mécanisme n'est pas connu.

Selon la présente invention, il a été démontré que l'activité 20 bactériostatique ou bactéricide des antibiotiques peut être évaluée par mesure du nombre de copies d'acides nucléiques de type ADN des bactéries en culture en présence ou non de l'antibiotique à tester et que ce nombre est proportionnel au titre bactérien, en particulier au nombre d'unités formant colonie.

Selon la présente invention, on mesure le nombre de copies d'acides 25 nucléiques dans un échantillon de culture bactérienne contenant une concentration donnée d'antibiotiques, après un temps d'incubation de la culture, et on le compare à l'inoculum de l'échantillon initial et à un échantillon en culture sans agent antimicrobien après le même temps d'incubation (témoin positif).

Si le nombre de copies d'ADN après un temps donné d'incubation de la 30 culture bactérienne en présence de l'antibiotique est égal au nombre de copies des bactéries dans l'inoculum, alors que le témoin positif montre une croissance bactérienne significative, la bactérie n'a pas poussé et est donc en présence d'un inhibiteur de la culture. Il a été démontré qu'il est possible de définir un

protocole de manière à ce que l'on puisse établir une corrélation linéaire entre la quantité d'ADN produite par la technique PCR et la croissance bactérienne.

En particulier, il a été défini un protocole d'évaluation de l'activité bactériostatique ou bactéricide d'un antibiotique impliquant la mise en œuvre 5 d'un même protocole de PCR quantitatif applicable à toute bactérie d'intérêt médical à croissance extra cellulaire ou intracellulaire, protocole d'amplification génique par PCR qui soit directement applicable aux inocula bactériens habituellement utilisés lors de la détermination de la sensibilité aux antibiotiques de ces bactéries, et en particulier une quantification directe des différents inocula 10 bactériens obtenus en présence ou non de l'antibiotique testé sans recours à des dilutions préalables de ces inocula.

Des titrages bactériens ont été réalisés parallèlement par la méthode de PCR et par les méthodes conventionnelles telle que la méthode des unités 15 formant colonie pour les bactéries à croissance extracellulaire, de façon à démontrer la concordance entre les résultats obtenus par les différentes méthodes de titrage.

En outre, cette technique de dénombrement des copies d'ADN présente l'avantage de réduire considérablement les temps d'incubation des cultures.

Plus précisément, la présente invention fournit une méthode de 20 détermination de l'activité bactériostatique ou bactéricide d'un antibiotique vis à vis d'une bactérie, caractérisée en ce qu'on effectue les étapes suivantes dans lesquelles :

1) on réalise des cultures *in vitro* de ladite bactérie à partir d'un inoculum de départ, respectivement en présence et en l'absence dudit antibiotique, 25 pendant un même temps défini d'incubation de ladite culture, permettant de multiplier le titre bactérien obtenu dans la culture sans antibiotique par rapport à celui de l'inoculum de départ d'au moins un facteur de 10^2 , et

2) on extrait les ADN bactériens de l'inoculum de départ et des cultures de ladite bactérie respectivement en présence et en l'absence dudit antibiotique, et 30 on réalise une amplification enzymatique de l'ADN d'un gène ou d'une portion de gène contenu dans lesdits ADN bactériens par une méthode du type PCR quantitative, selon un même protocole, ladite méthode permettant de déduire les

quantités d'ADN bactérien contenues dans lesdits inoculum de départ et lesdites cultures, et

3) on compare les nombre de copies d'ADN de l'inoculum de départ et des cultures bactériennes après un même temps d'incubation, respectivement 5 en présence et en l'absence d'antibiotique, et on détermine une activité bactériostatique ou bactéricide dudit antibiotique vis à vis de ladite bactérie si le nombre de copies d'ADN de ladite culture bactérienne après incubation en présence d'antibiotique est :

- inférieur ou égal au nombre de copies de l'ADN bactérien dans 10 l'inoculum de départ, et

- inférieur au nombre de copies de l'ADN bactérien après incubation de la culture en l'absence d'antibiotique.

Le temps d'incubation idéal est le temps minimum d'incubation des cultures permettant de différencier de façon statistiquement significative le titre 15 bactérien obtenu après ledit temps d'incubation dans la culture sans antibiotique par rapport à l'inoculum de départ, à savoir en pratique selon l'invention, une augmentation d'au moins 2 logs du titre bactérien après incubation par rapport à l'inoculum. Ceci permet en effet de mettre en évidence de façon significative l'effet inhibiteur d'un antibiotique.

20 Le temps d'incubation dépend essentiellement du temps de doublement de la bactérie étudiée, c'est-à-dire sa vitesse de croissance.

Le temps d'incubation nécessaire pour tester l'activité des antibiotiques 25 diffère selon les micro organismes considérés et le type de test (en culture cellulaire ou en milieu axénique considéré) mais est dans tous les cas inférieur à celui habituellement nécessaire avec les méthodes conventionnelles utilisées actuellement.

Pour une bactérie du type *Rickettsia*, ce temps est d'environ 5 à 7 jours, alors que pour les bactéries extra cellulaires en culture en milieu axénique, il n'est que de 3 à 6 heures, de préférence au moins 4 heures.

30 Il est nécessaire d'évaluer à la fois l'inoculum de départ et celui après incubation sans antibiotique, de façon à vérifier l'existence d'une croissance bactérienne en l'absence dudit antibiotique, et d'en déduire la présence ou non d'une inhibition de croissance en présence dudit antibiotique.

En ce qui concerne l'activité bactéricide, celle-ci est déterminée à l'étape 3 si on met en outre en évidence une diminution du nombre de copies de l'ADN correspondant à une diminution du titre bactérien d'au moins 3 logs, c'est-à-dire d'un facteur 10^3 .

Il est traditionnellement difficile d'obtenir des résultats reproductibles concernant le titrage par méthode de PCR quantitative des copies d'ADN contenues dans des suspensions bactériennes. Différents facteurs affectent la fiabilité des résultats obtenus par méthode de PCR quantitative, notamment le titre de l'inoculum bactérien à amplifier. En effet, le problème rencontré concerne la sensibilité de la technique PCR quantitative en fonction du nombre de copies d'ADN que contient la suspension bactérienne à étudier. Le nombre de copies d'ADN déterminé par la technique de PCR quantitative peut être sous évalué si un excès de copies d'ADN entraîne un effet d'inhibition de l'amplification par PCR ou si, au contraire, un nombre trop faible de copies d'ADN rend la réaction d'amplification moins efficace. De ce fait, la corrélation entre la numération des copies d'ADN et des titres bactériens se trouve biaisée.

Dans un mode préféré de réalisation, on réalise lesdites cultures à partir d'un inoculum de départ contenant un titre bactérien de 10^4 à 10^5 bactéries/ml pour les bactéries à croissance extracellulaire et pendant un dit temps d'incubation permettant d'obtenir une croissance des bactéries correspondant à une multiplication du titre bactérien en l'absence d'antibiotique d'un facteur 10^2 à 10^3 . Ces conditions de culture sont définies de façon à tester la sensibilité des bactéries aux antibiotiques pendant leur phase de croissance exponentielle.

Les inventeurs ont déterminé qu'en réalisant des cultures de manière à assurer une croissance de seulement 2 à 3 logs, c'est-à-dire pour les bactéries à croissance extracellulaire rapide avec des quantités de bactéries après culture en l'absence d'antibiotique comprises entre 10^6 et 10^8 bactéries/ml, notamment UFC/ml à partir d'un inoculum de départ contenant 10^4 à 10^5 bactéries/ml, on obtient une méthode d'évaluation de l'activité bactériostatique d'un antibiotique vis à vis d'une bactérie après un temps d'incubation réduit par rapport aux techniques antérieures, notamment un temps d'incubation de 4 heures pour une bactérie à croissance rapide en milieu axénique. En outre, il est ainsi possible de quantifier selon un même protocole d'amplification du type PCR quantitative les

ADN bactériens extraits des inocula et des cultures bactériennes obtenues après incubation en présence ou non de l'antibiotique testés directement sans dilution des ADN bactériens, en restant dans les limites des quantités d'ADN pour lesquelles la méthode d'amplification fournit des résultats fiables c'est à dire 5 correspondant à une portion linéaire de la courbe d'étalonnage permettant de quantifier par PCR le nombre de copies d'ADN.

Selon la présente invention, avantageusement on réalise une quantification directe d'un même volume de l'échantillon bactérien contenant desdits ADN bactériens de l'inoculum de départ et des échantillons desdites 10 cultures bactériennes obtenues après incubation, sans recours à des dilutions préalables desdits échantillons. En particulier, le nombre de copies d'ADN des suspensions bactériennes dont les titres variaient de 10^4 à 10^8 bactérie/ml pour les bactéries à croissance rapide a permis de déterminer l'activité des antibiotiques par quantification des copies d'ADN par un protocole d'amplification 15 par PCR ne nécessitant pas de dilution préalable des échantillons bactériens.

Dans un premier mode de réalisation, ladite bactérie est une bactérie à croissance en milieu axénique. Plus particulièrement et à titre illustratif, ladite bactérie est choisie parmi *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, de nombreuses autres espèces pouvant être testées par la méthode 20 selon l'invention. Dans ce premier mode de réalisation, on réalise en particulier une culture en milieu axénique pour un temps d'incubation de 3 à 6 heures, de préférence au moins 4 heures.

Dans un deuxième mode de réalisation, ladite bactérie est une bactérie à 25 croissance intracellulaire. Plus particulièrement, ladite bactérie est une bactérie du genre *Rickettsia* tel que *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi* et *Rickettsia conorii*. Plus particulièrement encore dans ce cas, on réalise ladite culture pendant un temps de 5 à 7 jours.

Pour des titres bactériens de 10^3 à 10^6 unités infectieuses par ml de milieu 30 de culture pour les bactéries *Rickettsia* sp., il a été possible de déterminer l'activité des antibiotiques par quantification des copies d'ADN par un même protocole d'amplification par PCR ne nécessitant pas de dilution préalable des échantillons bactériens.

5 Avantageusement, dans la méthode selon l'invention, on établit une courbe d'étalonnage permettant de convertir les nombres de copies d'ADN déterminés par ladite méthode PCR quantitative en titres bactériens (nombre de bactéries viables/ml de culture).

La courbe d'étalonnage des mesures par PCR quantitative est établie à l'aide de différentes dilutions, par exemple de raison 10 d'un inoculum de titre connu de la bactérie considérée.

10 Dans ce cas, l'amplification d'un échantillon bactérien (inoculum de départ ou échantillon prélevé après incubation en présence ou non de l'antibiotique) permet d'établir des courbes d'amplification, lesquelles sont des sigmoïdes. Seuls un petit nombre de cycles d'amplification, parmi les 30 ou 40 cycles programmés, correspondent à une amplification exponentielle et linéaire des cibles ADN de chaque échantillon. C'est pendant cette phase que le signal de 15 détection, notamment la fluorescence émise par incorporation d'un composé fluorescent à l'ADN néoformé, augmente de façon linéaire. La sigmoïde d'amplification peut alors être traduite en un point qui correspond au nombre de cycles nécessaire pour obtenir un seuil donné de fluorescence.

20 L'établissement de la courbe d'étalonnage permet donc de quantifier les échantillons bactériens prélevés en début et en fin d'expérimentation. Il suffit alors de montrer qu'il y a au moins 2 logs d'écart entre l'inoculum de départ et le titre obtenu dans la culture incubée sans antibiotique et que le titre de la culture incubée en présence de l'antibiotique est comparable à celui de l'inoculum pour démontrer un effet inhibiteur. Cette approche ne nécessite pas la détermination 25 des titres bactériens réels en terme d'UFC/ml mais seulement une évaluation de la différence dans le nombre de copies d'ADN entre inoculum de départ et culture bactérienne en présence ou non de l'antibiotique testé.

30 L'édit antibiotique est utilisé à une concentration correspondant à la concentration critique permettant de définir les zones de sensibilité de résistance, définie par le Comité Français de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) en France, ou en fonction du standard du pays considéré (par exemple le NCCLS pour les Etats Unis d'Amérique). En effet, une souche bactérienne est considérée comme sensible à un antibiotique

5 donné si sa croissance est inhibée par une concentration d'antibiotiques égale à la concentration critique inférieure définie notamment par le CA-SFM. Au contraire, une souche est considérée comme résistance à un antibiotique donné en l'absence d'inhibition de sa croissance lorsque l'antibiotique est ajouté à la concentration critique supérieure définie notamment par le CA-SFM.

10 Dans des modes de réalisation particuliers, ledit antibiotique est choisi parmi l'amoxicilline, la ciprofloxacine, la doxycycline, l'érythromycine, la gentamicine, la lévofoxacine, l'ofloxacine, la rifampicine, la téthromycine, le thiampénicol, la pénicilline, la ceftriaxone, l'oxacilline, le cotrimoxazole, le chloramphénicol.

Selon une première variante de réalisation, on réalise ladite méthode PCR quantitative en amplifiant un gène ou une portion de gène spécifique de ladite bactérie à l'aide d'amorces spécifiques de ladite bactérie.

15 Plus particulièrement pour les bactéries du genre *Rickettsia*, ladite méthode PCR quantitative est réalisée avec les amorces suivantes :

- amorce n°1 : 5'-GGG GGC CTG CTC ACG GCG G-3' et
- amorce n°2 : 5'-ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A-3'.

20 Selon une seconde variante de réalisation, on réalise ladite méthode PCR quantitative à l'aide d'amorce universelle pouvant amplifier un ADN contenu dans toute espèce bactérienne et on vérifie la spécificité de la réaction d'amplification vis à vis de ladite bactérie par le séquençage de l'ADN amplifié.

25 Ce choix d'une amorce universelle pose le problème théorique d'un manque de spécificité de l'amplification et du risque potentiel d'amplifier de l'ADN contaminant. Mais, la vérification de la spécificité des fragments d'ADN amplifiés par séquençage de cet ADN permet d'écartier les résultats montrant une amplification autre que celle attendue.

30 Plus particulièrement, on utilise des amorces universelles provenant de l'ADN ribosomal 16S ou de l'ADN codant pour l'ARN polymerase, de préférence l'ADN codant pour la sous unité B de l'ARN polymerase appelé gène *rpoB* (22-28).

Plus particulièrement encore, les amorces universelles utilisées pour ladite méthode PCR quantitative étaient les suivantes :

- amorce n°3 : 5'-ATT AGA TAC CCT GGT AG-3' et

- amorce n°4 : 5'-CAC GAG CTG ACG ACA-3'.

Dans un mode de réalisation avantageux, ladite méthode PCR quantitative est une méthode PCR quantitative en "temps réel" qui permet de déduire le nombre de copies de l'ADN contenu dans l'échantillon avant 5 amplification en fonction du nombre de cycles d'amplification nécessaire pour atteindre un seuil de détection donné à l'aide des sondes de détection mises en œuvre. Dans ce cas, la courbe d'étalonnage fournit le titre bactérien en fonction du nombre de cycles, qui est inversement proportionnel.

On peut utiliser comme méthode de PCR quantitative la technique dite "en 10 temps réel" ou "Real Time PCR", avec un appareil de type "Light Cycler" diffusé par la société Roche Biochemicals (17).

Cette technique a comme avantage d'une part, de réaliser une réaction de PCR en un temps rapide par rapport aux techniques utilisant un thermocycleur conventionnel. La raison en est que les variations de température au cours de la 15 réaction PCR se font en milieu aérien pour le "Light Cycler" et non en milieu hydrique comme pour les thermocycleurs conventionnels.

D'autre part, cette technique est dite "en temps réel" car la détection de l'amplification de l'ADN est réalisée en temps réel par méthode de fluorescence à l'intérieur d'un même appareil sans nécessiter de pratiquer une technique 20 supplémentaire en fin de réaction, par exemple par la réalisation d'une migration de l'ADN amplifié en gel d'agarose, comme d'est le cas avec les techniques conventionnelles.

L'appareil de type "Light Cycler" de Roche Biochemicals est un appareil combinant les capacités d'un thermocycleur et d'un fluorimètre (17). 25 L'amplification d'ADN par technique de PCR est détectée grâce à la présence de sonde s'hybridant spécifiquement avec l'ADN amplifié et générant un signal de fluorescence. Le nombre de cycles nécessaires à l'obtention d'un seuil de fluorescence permet de déduire la quantité d'ADN initialement contenue dans l'échantillon considéré (18).

30 Toutefois, la présente invention permet d'utiliser une technique de quantification des copies d'ADN quelle que soit la méthode PCR quantitative utilisée pour cette quantification.

En particulier la présente invention est applicable aux méthodes d'amplification de type RT-PCR mentionnées précédemment, c'est-à-dire des méthodes dans lesquelles on réalise une étape initiale de transcription inverse d'ARN messager en ADN.

5 La présente invention fournit également une méthode de détermination de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) d'un antibiotique vis à vis d'une bactérie en mettant en œuvre une méthode selon l'invention dans laquelle on réalise des dites cultures bactériennes à l'aide de concentrations croissantes dudit antibiotique.

10 En particulier, la présente invention permet de réaliser des cultures bactériennes de bactéries à croissance extracellulaire à partir d'un inoculum de départ contenant 10^4 à 10^5 bactéries/ml correspondant au standard actuel de détermination de CMI pour ce type de bactéries.

15 La présente invention a également pour objet une trousse (ou kit) pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins un antibiotique, de préférence une pluralité d'antibiotiques, et
- des réactifs utiles pour la mise en œuvre d'une réaction d'amplification d'ADN par une dite méthode PCR quantitative, et

20 - des réactifs utiles pour la mise en œuvre desdites cultures bactériennes.

Plus particulièrement, une trousse selon l'invention comprend des amorces d'amplification d'un gène ou d'une portion de gène de ladite bactérie.

Plus particulièrement encore, une trousse selon l'invention comprend avantageusement :

25 - différentes concentrations d'antibiotiques à tester,
- des réactifs permettant la croissance des bactéries telles qu'un milieu de culture Mueller Hinton pour les bactéries dites banales à croissance rapide en milieu axénique ou tout autre milieu de culture adapté à la bactérie étudiée si celle-ci nécessite des conditions de culture plus élaborées,

30 - des réactifs d'extraction des suspensions bactériennes obtenues avant et après incubation des cultures, en présence ou non de l'antibiotique testé,

- des réactifs pour la réaction d'amplification et de quantification de l'ADN, tels que l'ADN polymerase, les tampons de réaction, les amorces spécifiques

amplifiant notamment l'ADN ribosomal 16S ou l'ADN codant pour la sous unité B de l'ADN polymérase, ou tout autre ADN choisi dans le but de quantifier le nombre de copies d'ADN.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention 5 apparaîtront à la lumière des exemples qui vont suivre en référence aux figures 1 et 2.

La figure 1 représente une courbe de croissance de *Escherichia coli* en présence ou non d'amoxicilline (4µg/ml) déterminée par méthode densitométrique (DO) et par méthode de PCR quantitative (LC) décrite à 10 l'exemple 2.

La figure 2 représente une courbe de croissance de *Staphylococcus aureus* en présence ou non d'oxacilline (4µg/ml) déterminée par méthode densitométrique (DO) et par une méthode de PCR quantitative (LC) décrite à l'exemple 2.

15 Sur les figures 1 et 2 ("DO" représente les résultats par méthode de mesure de densité optique et LC représente les résultats par méthode PCR « Light Cycler »).

Exemple 1. Détermination par méthode de PCR quantitative de la sensibilité aux antibiotiques (CMI) de *Rickettsia felis*, *R. conorii* et *R. typhi* cultivées en milieu cellulaire.

La présente invention a d'abord été appliquée à l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques de l'espèce *Rickettsia felis*, récemment isolée et pour laquelle aucune donnée concernant sa sensibilité aux antibiotiques n'étaient disponibles. Afin de mettre au point cette invention, les inventeurs ont 25 testé en parallèle par cette technique la sensibilité de deux autres bactéries du genre *Rickettsia* (*R. typhi* et *R. conorii*), dont la sensibilité aux antibiotiques avait été préalablement testée par méthode des plages de lyse (4). Ces bactéries de croissance intracellulaire stricte représentent un exemple typique du type de bactéries sur lesquelles il est difficile de mesurer l'activité des antibiotiques.

30 Les bactéries appartenant au genre *Rickettsia* sont intracellulaires strictes. *R. felis* et *R. conorii* appartiennent au groupe des rickettsies responsables de fièvres boutonneuses (7,12). *R. conorii* est l'agent de la fièvre boutonneuse méditerranéenne (8). *R. typhi* appartient au groupe typhus, et est

l'agent du typhus murin (8). *R. felis* a d'abord été caractérisée en 1992 chez la puce de chat (*Ctenocephalides felis*) par Azad et col. (13), qui ont proposé le terme d'agent ELB. On a obtenu en culture *R. felis* pour la première fois en utilisant une lignée cellulaire de crapaud (la lignée XTC-2) incubée à 28°C (7).

5 Cet isolat présentait les même caractéristiques que l'agent ELB sur le plan génotypique, mais des caractères phénotypiques très différents.

La sensibilité aux antibiotiques des rickettsies est habituellement déterminée en culture de cellules Vero et utilise comme référence la méthode d'inhibition de formation de plages de lyse (4). Du fait de l'absence de formation 10 de plage de lyse par *R. felis* en cellules XTC-2 ou en cellules Vero, la méthode de référence ne pouvait pas être utilisée. On a donc élaboré deux nouvelles techniques, la première étant basée sur la coloration de Gimenez, et la deuxième sur la méthode de PCR quantitative. De façon à valider la méthode 15 par PCR quantitative, on a également testé en parallèle les espèces *R. conorii* et *R. typhi* par ces méthodes et par la méthode de référence des plages de lyse (4).

Souches bactériennes. *Rickettsia felis* a été isolée de puce de chat *Ctenocephalides felis* qui nous ont été fournies par le Dr. Jay Geaorgi (Flea Data Inc., Freeville, N.Y., USA) d'une part, et par le Dr. Lane Foil (LSU Entomology, 20 Baton Rouge, USA). L'isolement de cette espèce a été obtenu en cellules XTC2 dérivées de crapaud (*Xenopus laevis*), incubées à 28°C, en milieu de Lebowitz-15 contenant 2mM L-Glutamine (Gibco) et 5% de sérum de veau fœtal et 2% de tryptose phosphate (Gibco). Quatre isolats de *R. felis* ont été utilisé dans cette étude, nommés respectivement : « Pete1 », « Pete 2 », « Cal2 », et « Baton 25 Rouge ». On a testé également les souches *R. conorii* (ATCC VR-141), et *R. typhi* Wilmington (ATCC VR-144). Ces souches ont été cultivées en cellules Vero, en milieu de Eagle (Minimum Essential Medium) à 32°C, comme indiqué précédemment (4).

Antibiotiques. On a testé les antibiotiques suivants : amoxicilline (Beecham-30 Sevigne, Paris, France), gentamicine (Dakota Pharm, Creteil, France), ciprofloxacine (Bayer Pharma, Sebs, France), érythromycine (Abbott, Rungis, France), rifampicine (Cassenne, Puteaux, France), doxycycline (Pfizer, Neuilly, France), téolithromycine (Hoescht Marion Roussel, Romainville, France),

lévofloxacine (Hoescht Marion Roussel, Romainville, France), ofloxacine (Diamant, Puteaux, France), cotrimoxazole (Roche, Paris, France), and thiampénicol (Sanofi Winthrop, Gentilly, France). Les poudres antibiotiques ont été solubilisées en eau distillée stérile, sauf pour la télithromycine qui a été 5 d'abord solubilisée en méthanol puis en eau distillée stérile. Ces solutions stocks ont été conservées à -80°C. Les concentrations finales d'antibiotiques étaient préparées de façon extemporanée à partir de ces solutions stocks.

Détermination de la sensibilité aux antibiotiques. La sensibilité aux antibiotiques de *R. felis* a été déterminée par deux nouvelles techniques : une 10 technique utilisant la coloration de Gimenez, et une technique de PCR quantitative. *R. conorii* et *R. typhi* ont été testées par ces deux techniques et par la méthode des plages de lyse précédemment décrite (4) de façon à comparer les résultats obtenus avec les différentes méthodes. Les techniques basées sur la coloration de Gimenez et sur la PCR quantitative ont été réalisées 15 simultanément. Pour les souches de *R. felis*, des cellules XTC2 cultivées en plaques de 24 puits étaient infectées pendant 1h à température ambiante avec un inoculum de la souche testée. Les antibiotiques étaient ensuite ajoutés à des concentrations croissantes de raison 2, et les cultures ont été incubées à 28°C. *R. conorii* et *R. typhi* ont été testées selon la même procédure, mais en cultures 20 de cellules Vero, incubées à 32°C. Pour chaque souche de rickettsies, des cultures infectées ne recevant pas d'antibiotique servaient de contrôle de croissance (contrôle positif), alors que des cellules non infectées dépourvues d'antibiotique servaient de contrôle négatif. Immédiatement après infection des cellules (temps 0) et après 5 jours, 7 jours et 9 jours d'incubation des cultures, la 25 croissance des rickettsies en présence ou non de l'antibiotique testé était évaluée après récolte des cellules infectées, soit par méthode de Gimenez, soit par PCR quantitative. Les test ont été réalisés en duplicata et répétés pour confirmation des résultats.

Pour la technique de coloration de Gimenez, un étalement des cellules 30 récoltées dans chaque puits était réalisé par centrifugation, et les rickettsies étaient révélées par coloration de Gimenez. Les lames étaient ensuite examinées au microscope au grossissement x 1000, et la présence de cellules contenant des amas de rickettsies était notée. La concentration minimale

inhibitrice correspondait à la plus petite concentration d'antibiotique correspondant à l'absence de formation de ces amas bactériens intracellulaires ou à la présence de quelques amas en quantité inférieure ou égale à ceux visibles au niveau du contrôle correspondant au temps 0. Le contrôle positif 5 permettait de vérifier l'absence d'inhibiteur de croissance autre que l'antibiotique.

Pour la technique de PCR quantitative, les cultures cellulaires prélevées aux différents temps d'incubation étaient congelées à -20°C. L'ADN bactérien était ensuite extrait et quantifié par PCR quantitative sur un appareil de type Light Cycler (Roche Biochemicals, Mannheim, Germany). L'extraction d'ADN 10 était réalisée de la façon suivante. Après décongélation des tubes contenant les suspensions cellulaires, celles-ci étaient centrifugées à 5000rpm pendant 10 min. Les culots cellulaires étaient alors lavées deux fois en eau distillée stérile, et reprises dans 200µl d'eau distillée stérile. L'extraction d'ADN était ensuite obtenu par la méthode du Chelex à 20% (Biotechnology-grade chelating resin-Chelex 15 100, Biorad, Richmond, California) (15). En bref, 500µl de Chelex 20% étaient ajoutées à chaque suspension bactérienne, qui étaient ensuite agitées au vortex, et incubées en eau bouillante pendant 30 min. Les tubes étaient ensuite centrifugés à 14000rpm pendant 10min, et les surnageants contenant l'ADN extrait étaient récupérés et stockés à 4°C.

20 L'ADN contenu dans ces préparations était ensuite évalué par méthode de PCR quantitative au Light Cycler. La PCR a été réalisée avec les amores ADN CS877F (5'-GGG GGC CTG CTC ACG GCG G-3') et CS1258R (5'-ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A-3') permettant d'amplifier une partie du gène codant pour la citrate synthétase (16). Les mélanges de PCR ont été préparés 25 comme indiqué par le fabricant : 2 µl de Light Cycler DNA Master SYBR Green (Roche Biochemicals), 2,4 µl de MgCl₂ à 4mM, 1 µl de chacune des amores à 0,5 µM, 11,6 µl d'eau distillée stérile, et 2 µl d'ADN. Les conditions de PCR étaient les suivantes : dénaturation initiale par 1 cycle à 95°C pendant 120 sec, puis 40 cycles comportant une dénaturation à 95°C pendant 15sec, une 30 hybridation à 54°C pendant 8 sec, et une extension à 72°C pendant 15 sec avec une acquisition de fluorescence à 54° en mode simple. La spécificité de la PCR était confirmée par séquençage de l'ADN amplifié.

De façon à pouvoir convertir les résultats obtenus en PCR quantitative en quantité réelle de bactéries présents dans l'échantillon, des courbes d'étalonnage ont été réalisées. Pour ce faire, un inoculum bactérien préparé pour chaque souche de rickettsies était titré par dilutions limites de raison 10 5 ensemencés en culture cellulaire comme indiqué précédemment, la présence de rickettsies étant révélées par coloration de Gimenez après 9 jours d'incubation des cultures. Parallèlement, les mêmes dilutions étaient titrées par méthode de PCR quantitative, comme indiqué plus haut. Ceci permettait in fine de convertir les résultats de PCR quantitative en Unités Infectieuses/ml. Par méthode de 10 PCR quantitative, la CMI d'un antibiotique correspondait à la plus petite concentration d'antibiotique empêchant toute croissance de la souche testée, c'est à dire un titre bactérien après 9 jours d'incubation ces cultures inférieur ou 15 égal à celui de l'inoculum initial déterminé par la même technique.

Résultats.

Les CMI obtenus par les différentes méthodes citées pour *R. felis*, *R. conorii* et *R. typhi* sont résumées dans le tableau 1. Les résultats obtenus par ces différentes méthodes sont très concordants. Les résultats obtenus avec la méthode de PCR quantitative montrent la spécificité de cette technique du fait de la présence d'un pic de fusion unique qui indique que l'ADN amplifié au cours 20 des différentes réactions de PCR était toujours le même. Ces résultats ont été confirmé par ailleurs, par électrophorèse en gel et séquençage de l'ADN amplifié qui correspondait bien au poids moléculaire et à la séquence attendus. La courbe d'étalonnage réalisée permet de corréler les résultats de PCR quantitative avec les titres bactériens déterminés par méthode de dilutions 25 limites. Une relation linéaire entre les deux types de résultats pouvait être mise en évidence. Les titres bactériens utilisés pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques étaient de $2,7 \pm 0,5 \cdot 10^3$ /ml pour *R. felis*, $1,9 \pm 0,8 \cdot 10^3$ /ml pour *R. conorii* et *R. typhi*. Les titres étaient de $2,5 \pm 0,5 \cdot 10^5$, $1,4 \pm 0,2 \cdot 10^5$, et $1,8 \cdot 10^5$ respectivement pour *R. felis* après 9 jours d'incubation des cultures et 30 pour *R. conorii* et *R. typhi* après 5 jours correspondant à une croissance d'environ 2 logs. Les titres mesurés pour les rickettsies ne sont pas standardisés comme pour les bactéries à croissance rapide en milieu extracellulaire. D'autre part un titre en Unités Infectieuses par ml de milieu de surnageant de culture

(pour les rickettsies) n'est pas équivalent au titre en UFC/ml de bouillon pour les bactéries extracellulaires, du fait que les rickettsies ne poussent qu'à l'intérieur des cellules et pas dans le surnageant. Toutefois, la technique de PCR quantitative permet une standardisation de l'inoculum de rickettsies utilisé pour 5 les tests antibiotiques, ce qui n'était pas possible ou difficilement réalisable auparavant.

Les quatre souches de *R. felis* présentaient la même sensibilité aux antibiotiques, et étaient résistantes à l'amoxicilline, à la gentamicine, et au cotrimoxazole. Les CMI d'érythromycine variaient de 16 à 32 µg/ml, et celles de 10 la téthromycine variaient de 1 à 2 µg/ml. Les CMI de fluoroquinolones variaient de 0,5 à 1 µg/ml, et celles du chloramphénicol de 1 à 4 µg/ml. La rifampicine était bactériostatique à des concentrations variant de 0,06 à 1 µg/ml. La doxycycline était l'antibiotique le plus actif, avec des CMI variant de 0,06 à 0,125 µg/ml.

15 Les résultats obtenus avec la méthode selon l'invention sont tout à fait corrélés, concernant *R. conorii* et *R. typhi*, aux données obtenues antérieurement avec les techniques de plages de lyse et colorimétrique (4), ce qui valide notre technique. Ces deux dernières techniques n'étant pas utilisables pour *R. felis*, nous avons validés les résultats obtenus en PCR quantitative pour 20 cette espèce par une deuxième technique basée sur la formation d'amas de rickettsies intracellulaires révélé par coloration de Gimenez. Là encore, nos résultats montrent une bonne corrélation entre la méthode de PCR quantitative et la technique utilisant la coloration de Gimenez. *R. felis* est donc, comme les autres rickettsies, très sensible à la doxycycline, à la rifampicine, au 25 thiampénicol, à la téthromycine, et aux fluoroquinolones. Par contre, sa relative résistance à l'érythromycine permet de supposer que cette espèce est plus proche des rickettsies du groupe boutonneux. En effet, nous avons montré précédemment que les rickettsies du groupe boutonneux sont naturellement plus résistantes à l'érythromycine que celles du groupe typhus (4). Ce résultat est 30 d'autre part en accord avec les études phylogénique situant *R. felis* dans le groupe boutonneux, entre *R. akari* et *R. australis* (7,12,19). *R. felis* est par contre résistante, à l'instar des autres rickettsies, aux bêta-lactamines, aux aminosides, et au cotrimoxazole. Ces résultats diffèrent de ceux publiés par Radulovic et col.

(20), mais ces auteurs ont publiés un erratum indiquant que la souche étudiée était en fait *R. typhi* et non *R. felis* (21).

On rapporte donc ici la première utilisation de cette technique pour un pathogène intracellulaire strict. Du fait de sa simplicité et de sa fiabilité, cette méthode peut avantageusement remplacer la technique de référence des plages de lyse beaucoup plus fastidieuse. Les applications de cette technique de détermination de la sensibilité aux antibiotiques peuvent être étendues à l'ensemble des bactéries, intracellulaires.

10 **Table 1.** Sensibilité de *R. felis*, *R. conorii* et *R. typhi* à différents antibiotiques déterminée par méthode de PCR quantitative comparativement aux méthodes des plages de lyse et à une nouvelle technique basée sur la coloration de Gimenez.

15		CMIs exprimées en µg/ml									
		<i>R. typhi</i>				<i>R. felis</i>				<i>R. conorii</i>	
		Cal2, Pete1, Pete2		Baton Rouge		PL	Gim	PCRq	PA	Gim	
20		Gim	PCRq	Gim	PCRq	PL	Gim	PCRq	PA	Gim	
	Amoxicilline	128	256	256	256	128	128	256	128	256	256
	Ciprofloxacine	0.5	1	1	0.5	1	1	1	0.5	0.5	0.5
	Doxycycline	0.06	0.06	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.06	0.06	
			0.125								
	Erythromycine	32	16	16	16						
	Gentamicine	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32	>32
	Lévofoxacine	0.5	1	1	0.5		1	1	0.5	0.5	0.5
	Ofloxacine	0.5	1	1	0.5	1	1	1	1	1	1
	Rifampicine	0.5	0.06	1	0.25	0.25	0.25	0.06	0.125	0.25	0.06
25	SXT/TMP	>16/4	>16/4	>16/4	>16/4	>16/4	>16/4	>16/4	>16/4	>16/4	>16/4
	Télithromycine	1	1	1	1	0.5	1	1	0.5	0.5	1
	Thiamphénicol	2	1	4	2	1	1	1	1	1	1

Gim : méthode par coloration de Gimenez

PCRq : méthode par PCR quantitative

PL : méthode des plages de lyse

Exemple 2 : Détermination de la sensibilité aux antibiotiques de différentes bactéries de croissance en milieu axénique par méthode de PCR quantitative.

De façon à étendre l'invention à l'ensemble des bactéries, les inventeurs 5 ont testé la sensibilité à certains antibiotiques de bactéries à croissance en milieu axénique appartenant notamment à différentes espèces mentionnées ci-après. Les inventeurs ont ainsi évalué la sensibilité de ces bactéries à différents antibiotiques par mesure de leur croissance en présence ou non de différents antibiotiques testés en concentration critique permettant de définir les zones de 10 sensibilité et de résistance selon le Comité Français de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

Souches. Les souches testées appartiennent aux espèces suivantes : *Escherichia coli* (une souche sensible à l'amoxicilline et une souche résistante à cet antibiotique); *Enterobacter cloacae* (souche résistante à la ceftriaxone par céphalosporinase déréprimée) ; *Salmonella enteritidis* (souche sensible à la ceftriaxone) ; *Shigella dysenteriae* (souche sensible à la ceftriaxone) ; *Enterococcus faecalis* (souche sensible à l'amoxicilline) ; *Staphylococcus aureus* (une souche méticillino-sensible et une souche méticillino-résistante) ; *Campylobacter jejuni* (souche sensible à l'érythromycine), *Streptococcus pneumoniae* (souche de sensibilité intermédiaire à la pénicilline G) ; *Bartonella quintana* Oklahoma et *Bartonella henselae* Houston-1)..

Antibiotiques. Les antibiotiques suivants ont été testés : pénicilline G (Diamant, Puteaux, France), amoxicilline (Beecham Laboratories, Nanterre, France), ceftriaxone (Roche, Neuilly-sur-Seine, France), oxacilline (Panpharma ZI du 25 Clairay 35133 Luitré - Fougères France), érythromycine (Abbott Laboratories, Rungis, France), doxycycline (Pfizer, Neuilly, France), rifampicine (Cassenne, Puteaux, France). Ces différents antibiotiques ont été testés aux différentes concentrations critiques définies pour chaque pathogène testé d'après les recommandations du comité français de l'antibiogramme de la société française 30 de microbiologie (CA-SFM).

Détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Pour chaque souche bactérienne, un inoculum a été préparé en milieu de Mueller Hinton (milieu de référence pour la détermination des CMI) titré par méthode

densitométrique à ~10⁵ UFC/ml (soit 0,5 unités standard McFarland). Cet inoculum a été réparti (0.9ml/puits) en plaques de 24 puits. Les antibiotiques ont été ensuite ajoutés (0.1ml/puits d'une solution antibiotique 10 x concentrée par rapport à la concentration finale désirée). Certains puits ne recevant pas 5 d'antibiotique ont servis de contrôle de croissance. Les cultures ont été incubées à 37°C, pendant une durée totale de 18 heures. Les cultures ont été récoltées à différents intervalles (0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 9h, 12h, 18h) de façon à déterminer une courbe de croissance bactérienne en présence ou en l'absence de l'antibiotique considéré et à titrer l'inoculum bactérien initial (temps 0h). Ces 10 différentes suspensions bactériennes ont ensuite été titrées par la méthode de PCR quantitative.

Titrage des suspensions bactériennes par PCR quantitative.

Les titrages bactériens ont été effectués par méthode de PCR quantitative, utilisant le Light Cycler comme indiqué précédemment pour 15 *Rickettsia felis*.

L'extraction d'ADN a été réalisé par méthode du Chelex, selon une procédure identique à celle décrite pour *R. felis*. Les mélanges et cycles de PCR ont été réalisés selon les recommandations de Roche Biochemicals. Les amorces utilisées pour la PCR étaient les suivantes : 800F (5'-ATT AGA TAC 20 CCT GGT AG-3') et 1050R (5'-TGT CGT CAG CTC GTG -3'). Ces amorces permettent l'amplification d'un fragment de ~250 bases du gène codant pour l'ARN16S de toute bactérie (amorces universelles), et ont été utilisées antérieurement dans le laboratoire à des fins diagnostiques. La spécificité de la réaction d'amplification a été vérifiée en gel d'agarose et par séquençage de 25 l'ADN amplifié. Pour chaque souche bactérienne testée, une courbe d'étalonnage était réalisée de façon à convertir les résultats obtenus en PCR quantitative en quantité réelle de bactéries présentes dans l'échantillon. Pour ce faire, un inoculum bactérien de titre connu obtenu après incubation de la souche considérée pendant 24h en milieu Mueller Hinton était dilué (dilutions de raison 30 10, de 10⁻¹ à 10⁻¹²). Chaque dilution était titrée parallèlement par méthode de PCR quantitative et par méthode des unités formant colonie (UFC) après ensemencement de 100µl de dilution sur une gélose Mueller Hinton et incubation de ces géloses 24h à 37°C. Ceci permettait in fine de convertir les résultats de

PCR quantitative en UFC/ml. Par méthode de PCR quantitative, la CMI d'un antibiotique correspond à la plus petite concentration d'antibiotique empêchant toute croissance de la souche testée, c'est à dire un titre bactérien après incubation des cultures inférieur ou égal à celui de l'inoculum initial déterminé 5 par la même technique.

Résultats.

Les résultats obtenus initialement ont montré la possibilité de sous évaluation du nombre de copies d'ADN par PCR quantitative, soit du fait du manque de sensibilité de cette méthode lorsque l'inoculum initial contenait un 10 nombre de copies d'ADN trop faible, soit au contraire lorsque le nombre de copies d'ADN contenu dans l'inoculum était trop élevé entraînant une inhibition de la réaction d'amplification par PCR. Les figures 1 et 2 illustrent le phénomène d'inhibition de la PCR en montrant l'absence de corrélation entre titres obtenus par densitométrie et PCR lorsque le nombre de copies d'ADN dans l'échantillon 15 est trop important, notamment au-delà de 10^8 bactéries/ml. Il a donc été défini une courbe d'étalonnage avec comme inoculum bactérien maximum celui obtenu après un temps d'incubation des cultures permettant de mettre en évidence une croissance de ~3 log de l'inoculum bactérien initial (par exemple la suspension bactérienne obtenue après 6 heures de culture pour *Escherichia coli* 20 ou *Staphylococcus aureus*) et des dilutions de raison 10 de cet inoculum. De même, cette courbe d'étalonnage n'a été utilisée que dans sa partie linéaire. Pour les mêmes raisons, on a eu des difficultés à amplifier avec un même protocole de PCR quantitative des inocula bactériens dont le nombre d'unités 25 formant colonie pouvait varier de plus de 4 log après 12 heures ou plus d'incubation des cultures. Ces titres bactériens n'étant pas nécessaires pour la détermination de l'activité des antibiotiques (qui était visible après seulement 4 heures d'incubation des cultures) nous ne les avons pas considérés. Au total on a titré le nombre de copies d'ADN sur des suspensions bactériennes dont les titres variaient de $\sim 10^4$ – 10^5 UFC/ml (inoculum initial) à $\sim 10^6$ – 10^8 UFC/ml (après 4 30 à 6 heures d'incubation). Ceci a permis de déterminer l'activité des antibiotiques par quantification des copies d'ADN par un protocole d'amplification par PCR ne nécessitant pas de dilution préalable des échantillons bactériens.

Les résultats obtenus après mise au point de notre méthode montrent la possibilité de définir une courbe de croissance de *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* par méthode de PCR quantitative (figures 1 et 2). Ces courbes sont superposables à celles déterminées par méthode des unités formant colonie (figures 1 et 2). On note une augmentation de ~3 log pour chacune de ces deux espèces après 6 heures d'incubation des cultures. On a testé l'activité de l'amoxicilline sur la souche d'*E. coli* sensible à cet antibiotique, à la concentration critique inférieure en deçà de laquelle est définie la zone de sensibilité (c'est à dire 4 μ g/ml). Les courbes de croissance en présence de l'antibiotique obtenues par méthode des ufc et par PCR quantitative sont superposables, et montrent une stagnation de l'inoculum bactérien au cours du temps, ce qui correspond à un effet bactériostatique. On a testé de façon similaire l'activité de l'oxacilline (2 μ g/ml) vis à vis d'une souche de *S. aureus* sensible à cet antibiotique. Les courbes obtenues (méthode des ufc et PCR quantitatives) sont là encore superposables, et montrent un effet bactériostatique de l'oxacilline vis à vis de cette souche.

Discussion.

Les résultats obtenus montrent la possibilité d'établir une courbe de croissance de *Escherichia coli* (bactérie à Gram négatif) et de *Staphylococcus aureus* (bactérie à Gram positif) au cours du temps par méthode de PCR quantitative, et ceci de façon superposable à la méthode de référence de dénombrement des unités formant colonie. On a testé dans un premier temps l'activité de l'amoxicilline vis à vis d'une souche de *E. coli* sensible à cet antibiotique, et l'activité de l'oxacilline vis à vis d'une souche sensible de *S. aureus*. De façon à simplifier le test, on a testé ces antibiotiques à la concentration critique inférieure définie par le CA-SFM. Là encore les résultats obtenus par méthode de PCR quantitative sont tout à fait concordants avec ceux de la technique des ufc. L'absence de croissance de la souche d'*E. coli* en présence d'amoxicilline confirme sa sensibilité à cet antibiotique. Il en est de même de la souche de *S. aureus* vis à vis de l'oxacilline. Les figures 1 et 2 montrent de plus, une différence significative en les courbes de croissance obtenues en présence ou en absence d'antibiotique après seulement 4 heures d'incubation des cultures. Les résultats préliminaires confirment donc la

possibilité de définir dans un laps de temps court (de l'ordre de 4 heures) la sensibilité aux antibiotiques de bactéries à croissance en milieu axénique.

Les résultats par PCR quantitative permettent de définir la sensibilité d'une souche bactérienne par rapport à un antibiotique donné dans un délai de 4 5 heures d'incubation des cultures, alors que le délai habituel pour les techniques conventionnelles est de 18 heures, et reste de 6 à 8 heures, voire plus pour les techniques automatisées (5). Ceci correspond à un avantage notable de la technique de PCR quantitative par rapport aux techniques disponibles actuellement pour la détermination de la sensibilité des bactéries couramment 10 isolées en laboratoire de microbiologie clinique.

References bibliographiques

1. Pahl A, Kuhlbrandt U, Brune K, Rollinghoff M, Gessner A. Quantitative detection of *Borrelia burgdorferi* by real-time PCR. *J.Clin.Microbiol.* 1999;37:1958-63.
- 5 2. Smythies LE, Chen JA, Lindsey JR, Ghiara P, Smith PD, Waites KB. Quantitative analysis of *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. *J Immunol Methods* 2000;242(1-2):67-78.
- 10 3. Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J. Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* 2000;38:3194-9.
4. Rolain JM, Maurin M, Vestris G, Raoult D. In vitro susceptibilities of 27 rickettsiae to 13 antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:1537-41.
- 15 5. Ling TK, Tam PC, Liu ZK, Cheng AF. Evaluation of VITEK 2 Rapid Identification and Susceptibility Testing System against Gram-Negative Clinical Isolates. *J.Clin.Microbiol.* 2001;39:2964-6.
6. Lorian V. Lorian V, editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991.
- 20 7. Raoult D, La Scola B, Enea M, Fournier PE, Roux V, Fenollar F, Galvao MA, Delamballerie X. A flea-associated rickettsia pathogenic for humans. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:73-81.
8. Raoult D, Roux V. Rickettsiosis as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin.Microbiol.Rev.* 1997;10:694-719.
- 25 9. Chisholm SA, Owen RJ, Teare ELSS. PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and real-time determination of clarithromycin resistance directly from human gastric biopsy samples. *J.Clin.Microbiol.* 2001;39:1217-20.
10. Wilson DL, Abner SR, Newman TC, Mansfield LS, Linz JE. Identification of ciprofloxacin-resistant *Campylobacter jejuni* by use of a fluorogenic PCR assay. *J.Clin.Microbiol.* 2000;38:3971-8.

11. Chang LK, Liu ST. Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Clin.Microbiol.* 2000;38:3194-9.
- 5 12. Bouyer DH, Stenos J, Croquet-Valdes P, Moron CG, Popov VL, Zavala-Velazquez JE, Foil LD, Stothard DR, Azad AF, Walther DH. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 2001;51:339-47.
- 10 13. Azad AF, Sacci JB, Nelson WM, Dasch GA, Schmidtmann ET, Carl M. Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like rickettsia found in cat fleas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1992;89:43-6.
14. Goerke C, Bayer MG, Wolz C. Quantification of bacterial transcripts during infection using competitive reverse transcription-PCR (RT-PCR) and LightCycler RT-PCR. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* 2001;8:279-82.
- 15 15. Stein A, Raoult D. A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues. *Nucleic Acid Research* 1992;20:5237-8.
16. Raoult D, Roux V, Ndiokubwaho JB, Bise G, Baudon D, Martet G, Birtles RJ. Jail fever (epidemic typhus) outbreak in Burundi. *Emerg.Infect.Dis.* 1997;3:357-60.
- 20 17. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997;22:176-81.
18. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 1997;22:130-8.
- 25 19. Higgins JA, Radulovic ME, Schriefer ME, Azad AF. *Rickettsia felis*: a new species of pathogenic rickettsia isolated from cat fleas. *J.Clin.Microbiol.* 1996;34:671-4.
20. Radulovic S, Higgins JA, Jaworski DC, Azad AF. In vitro and in vivo antibiotic susceptibilities of ELB rickettsiae. *Antimicrob.Agents Chemother.* 1995;39:2564-6.
- 30 21. Radulovic S, Higgins JA, Jaworski DC, Dasch GA, Azad AF. In vitro and in vivo antibiotic susceptibilities of ELB rickettsia (erratum vol 39, pg 2564, 1996). *Antimicrob.Agents Chemother.* 1996;40:2912-.

22. Drancourt M, Carlioz A, Raoult D. rpoB sequence analysis of cultured *Tropheryma whippelii*. *J Clin Microbiol* 2001;39(7):2425-30.
23. Renesto P, Gautheret D, Drancourt M, Raoult D. Determination of the rpoB gene sequences of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* for 5 phylogenetic analysis. *Res Microbiol* 2000;151(10):831-6.
24. Renesto P, Gouvernet J, Drancourt M, Roux V, Raoult D. Use of rpoB gene analysis for detection and identification of *Bartonella* species. *J Clin Microbiol* 2001;39(2):430-7.
25. Renesto P, Lorvellec-Guillon K, Drancourt M, Raoult D. rpoB gene analysis 10 as a novel strategy for identification of spirochetes from the genera *Borrelia*, *Treponema*, and *Leptospira*. *J Clin Microbiol* 2000;38(6):2200-3.
26. Drancourt M, Raoult D. Characterization of mutations in the rpoB gene in naturally rifampin-resistant *Rickettsia* species. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(10):2400-3.
- 15 27. Mollet C, Drancourt M, Raoult D. Determination of *Coxiella burnetii* rpoB sequence and its use for phylogenetic analysis. *Gene* 1998;207(1):97-103.
28. Mollet C, Drancourt M, Raoult D. rpoB sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol* 1997;26(5):1005-11.
29. Jung R, Soondrum K, Neumaier M. Quantitative PCR. *Clin. Chem. Lab. 20* Med.
- 2000 ; 38(9) :833-836
30. Bustin,S.A. Absolute quantification of mRNA using rea-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* 2000 ;25(2) :169-193

REVENDICATIONS

1. Méthode de détermination de l'activité bactériostatique ou d'un antibiotique vis à vis d'une bactérie, caractérisée en ce qu'on effectue les étapes suivantes dans lesquelles :

5 1) on réalise des cultures *in vitro* de ladite bactérie à partir d'un inoculum de départ, respectivement en présence et en l'absence dudit antibiotique pendant un même temps défini d'incubation de ladite culture, permettant de multiplier le titre bactérien obtenu dans la culture sans antibiotique par rapport à celui de l'inoculum de départ d'un facteur, d'au moins 10^2 , et

10 2) on extrait les ADN bactériens de l'inoculum de départ et des cultures de ladite bactérie respectivement en présence et en l'absence dudit antibiotique, après ledit temps d'incubation, et on réalise une amplification enzymatique de l'ADN d'un gène ou d'une portion de gène contenu dans lesdits ADN bactériens par une méthode du type PCR quantitative, selon un même protocole, ladite 15 méthode permettant de déduire les quantités d'ADN bactérien contenues dans ledit inoculum de départ et lesdites cultures, et

20 3) on compare les nombre de copies d'ADN de l'inoculum de départ et des cultures bactériennes après un même temps d'incubation, respectivement en présence et en l'absence d'antibiotique, et on détermine une activité bactériostatique ou bactéricide dudit antibiotique vis à vis de ladite bactérie si le nombre de copies d'ADN de ladite culture bactérienne après incubation de la culture en présence d'antibiotique est :

25 - inférieur ou égal au nombre de copies de l'ADN bactérien dans l'inoculum de départ, et

25 - inférieur au nombre de copies de l'ADN bactérien après incubation de ladite culture en l'absence d'antibiotique.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite bactérie est une bactérie à croissance en milieu axénique.

30 3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'on réalise une culture en milieu axénique pendant un temps d'incubation de 3 à 6 heures.

4. Méthode selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisée en ce que ladite bactérie est choisie parmi *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*,

Shigella dysenteriae, Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus, Enterobacter cloacae.

5. Méthode selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce 'on réalise lesdites cultures à partir d'un inoculum de départ contenant un titre bactérien de 10^4 à 10^5 bactéries/ml et pendant un dit temps d'incubation permettant d'obtenir une croissance des bactéries correspondant à une multiplication du titre bactérien en l'absence d'antibiotique d'un facteur 10^2 à 10^3 .

10 6. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite bactérie est une bactérie à croissance intracellulaire

7. Méthode selon la revendication 6, caractérisée en ce que ladite bactérie est une bactérie du genre *Rickettsia* telle que *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi* et *Rickettsia conorii*.

15 8. Méthode selon l'une des revendications 6 ou 7, caractérisée en ce qu'on réalise ladite culture pendant un temps de 5 à 7 jours.

9. Méthode selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisée en ce qu'on réalise une quantification directe d'un même volume de l'échantillon bactérien desdits ADN bactériens de l'inoculum de départ et des échantillons desdites cultures bactériennes obtenues après incubation, sans recours à des dilutions préalables desdits échantillons.

20 10. Méthode selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce qu'on établit une courbe d'étalonnage permettant de convertir les nombres de copies d'ADN déterminés par ladite méthode PCR quantitative en titres bactériens.

25 11. Méthode selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que ladite méthode PCR quantitative est une méthode PCR quantitative dite en temps réel qui permet de déduire le nombre de copies de l'ADN contenu dans l'échantillon avant amplification en fonction du nombre de cycles d'amplification nécessaire pour atteindre un seuil de détection donné à l'aide des sondes de détection mises en œuvre.

30 12. Méthode selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'on réalise ladite méthode PCR quantitative en amplifiant un gène ou une portion de gène spécifique de ladite bactérie à l'aide d'amorces spécifiques de ladite bactérie.

13. Méthode selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'on réalise ladite méthode PCR quantitative à l'aide d'amorce universelle pouvant amplifier un ADN contenu dans toute espèce bactérienne et on vérifie la spécificité de la réaction d'amplification vis à vis de ladite bactérie par le 5 séquençage de l'ADN amplifié.

14. Méthode selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'on utilise des amorces universelles provenant de l'ADN ribosomal 16S ou de l'ADN codant pour l'ARN polymerase, de préférence l'ADN codant pour la sous-unité B de l'ARN polymerase appelé gène *rpoB*.

15. Méthode selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit antibiotique est utilisé à une concentration correspondant à la concentration critique permettant de définir les zones de sensibilité de résistance selon le Comité Français de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM).

16. Méthode selon l'une des revendications précédentes, caractérisée en ce que ledit antibiotique est choisi parmi l'amoxicilline, la ciprofloxacine, la doxycycline, l'érythromycine, la gentamicine, la lévofloxacine, l'ofloxacine, la rifampicine, la télithromycine, le thiampénicol, la pénicilline, la ceftriaxone, l'oxacilline, le cotrimoxazole, le chloramphénicol.

17. Méthode selon la revendication 14, caractérisée en ce que les amorces utilisées pour ladite méthode PCR quantitative étaient les suivantes :

- amorce n°3 : 5'-ATT AGA TAC CCT GGT AG-3' et
- amorce n°4 : 5'-CAC GAG CTG ACG ACA-3'.

18. Méthode selon les revendications 7 et 12, caractérisée en ce que 25 ladite méthode PCR quantitative est réalisée avec les amorces suivantes :

- amorce n°1 : 5'-GGG GGC CTG CTC ACG GCG G-3' et
- amorce n°2 : 5'-ATT GCA AAA AGT ACA GTG AAC A-3'.

19. Méthode selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisée en ce qu'on détermine la CMI (concentration minimale inhibitrice) d'un antibiotique vis à vis d'une dite bactérie en réalisant lesdites cultures bactériennes à l'aide de 30 concentration croissante dudit antibiotique.

20. Trousse utile pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- au moins un antibiotique, de préférence une pluralité d'antibiotiques, et
- des réactifs utiles pour la mise en œuvre d'une réaction d'amplification
d'ADN par

une dite méthode PCR quantitative, et
5 - des réactifs utiles pour la mise en œuvre desdites cultures bactériennes.

21. Trousse selon la revendication 20, caractérisée en ce qu'elle comprend des amorces d'amplification d'un gène ou d'une portion de gène de ladite bactéries.

1 / 1

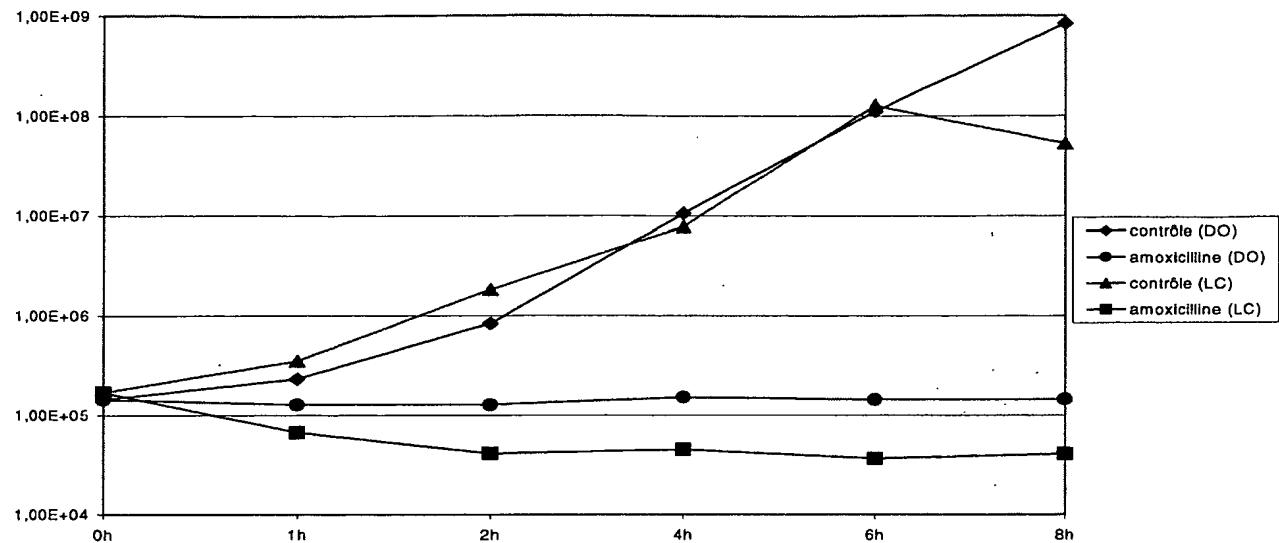


Figure 1

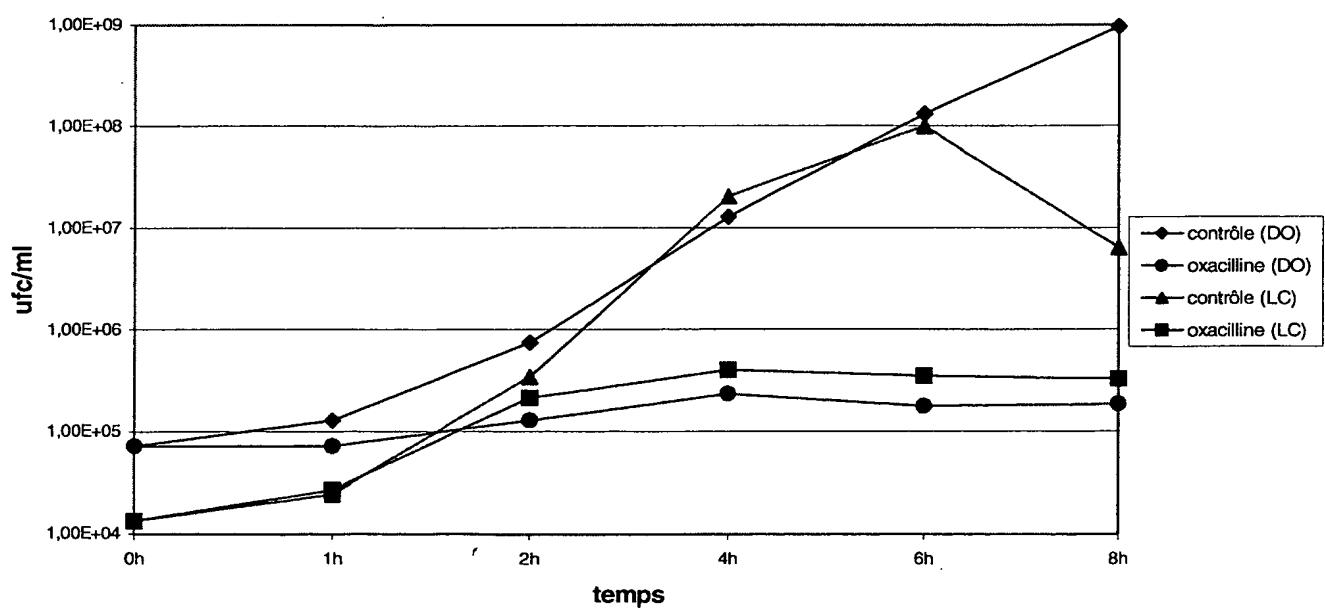


Figure 2

LISTE DE SEQUENCES

<110> Université de la Méditerranée

<120> Evaluation de l'activité bactériostatique des antimicrobiens
par PCR quantitative

<130> H52437 cas 6

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Rickettsia

<220>

<223> Description de la séquence : amorce
du gène de la citrate synthétase

<400> 1

gggggcctgc tcacggcgg

<210> 2

<211> 22

<212> ADN

<213> Rickettsia

<220>

<223> Description de la séquence : amorce
du gène de la citrate synthétase

<400> 2

aatgcaaaaaa gtacagtcaa ca

<210> 3

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<400> 3

attagatacc ctggtag

<210> 4

<211> 15

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<400> 4

cacgagctga cgaca